

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Abteilung für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Außenstelle Kleinmachnow<sup>1</sup>), und Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit, Braunschweig und Berlin<sup>2</sup>)

## ***Bursaphelenchus*-Arten (Nematoda, Parasitaphelenchidae) in Nadelgehölzen in Deutschland und ihre ITS-RFLP-Muster**

***Bursaphelenchus* species (Nematoda, Parasitaphelenchidae) found in coniferous trees in Germany and their ITS-RFLP patterns**

Von Helen Braasch<sup>1</sup>), Kai Metge<sup>2</sup>) und Wolfgang Burgermeister<sup>2</sup>)

### **Zusammenfassung**

Seit 1996 wurden in Deutschland Untersuchungen an geschädigten Koniferenbeständen und an holz- und rindenbrütenden Insekten auf das Vorkommen von *Bursaphelenchus*-Arten durchgeführt. In 78 % von 175 untersuchten Holzproben wurden Nematoden festgestellt. *Bursaphelenchus*-Arten traten in 15 % der Holzproben auf, wobei es sich um *B. mucronatus*, *B. fraudulentus*, *B. sexdentati*, *B. poligraphi*, *B. eggersi*, *B. hofmanni*, *B. hellenicus*, *B. borealis*, und *B. spec.* handelte. *B. mucronatus* war die häufigste Art und wurde erstmals an Fichte (*Picea abies*) in Deutschland nachgewiesen. 11 von 13 Herkünften gehörten zum europäischen Genotyp, während erstmals für Europa in 2 Fällen auch der ostasiatische Genotyp festgestellt wurde. *B. fungivorus* wurde in einem rindenhaltigen Pflanzsubstrat in einem Gewächshaus gefunden. Die festgestellten *Bursaphelenchus*-Arten wurden auch durch ITS-RFLP-Analyse anhand spezifischer DNA-Fragmentmuster charakterisiert.

Fast 6000 holz- und rindenbrütende, im Freiland gesammelte Scolytiden (18 Arten), Cerambyciden (13 Arten), Curculioniden (2 Arten) und Buprestiden (2 Arten) wurden auf das Vorhandensein von Dauerlarven untersucht. Nur 5 der untersuchten Käferarten trugen eindeutig definierte *Bursaphelenchus*-Dauerlarven, während  $\frac{2}{3}$  der Käferarten insgesamt Dauerstadien von Nematoden aufwiesen. *Monochamus galloprovincialis* wurde als Vektor für *B. mucronatus* in Deutschland nachgewiesen. *Hylurgops palliatus* trug Dauerlarven von *B. poligraphi*, *B. eggersi* und *B. sexdentati*, *Dryocoetes autographus* von *B. leoni* und *B. borealis*, *Polygraphus poligraphus* von *B. poligraphus* und *Tomicus piniperda* von *B. sexdentati*.

**Stichwörter:** *Bursaphelenchus* spp., ITS-RFLP, Vektoren, *Monochamus*, Cerambycidae, Scolytidae, Curculionidae, Buprestidae, Verbreitung, Nadelgehölze, Deutschland

### **Abstract**

Since 1996 damaged coniferous trees and wood and bark breeding insects have been investigated for the presence of *Bursaphelenchus* species in Germany. Out of 175 wood samples examined, 78 % contained nematodes. *Bursaphelenchus* species were present in 15 % of the samples. The species found were *B. mucronatus*, *B. fraudulentus*, *B. sexdentati*, *B. poligraphi*, *B. eggersi*, *B. hofmanni*, *B. hellenicus*, *B. borealis* and *B. spec.* The

most frequently found species was *B. mucronatus*. For the first time it was found on fir in Germany. Eleven out of 13 *B. mucronatus* provenances belonged to the European genotype, whereas the East Asian genotype was found in two places for the first time in Europe. *B. fungivorus* was found in a growing medium containing bark in a glass house. The *Bursaphelenchus* species found were also characterized by ITS-RFLP analysis on the basis of specific DNA fragment patterns.

Nearly 6000 wood and bark borers of scolytids (18 species), cerambycids (13 species), curculionids (2 species) and buprestids (2 species) collected in the open were examined for dauerlarvae. Only 5 species carried clearly identifiable *Bursaphelenchus* dauerlarvae, while in total two thirds of the beetles had dauerlarvae of nematodes. *Monochamus galloprovincialis* proved to be a vector of *B. mucronatus* in Germany. *Hylurgops palliatus* had dauerlarvae of *B. poligraphi*, *B. eggersi* and *B. sexdentati*, *Dryocoetes autographus* of *B. leoni* and *B. borealis*, *Polygraphus poligraphus* of *B. poligraphus* and *Tomicus piniperda* of *B. sexdentati*.

**Key words:** *Bursaphelenchus* spp., ITS-RFLP, vectors, *Monochamus*, Cerambycidae, Scolytidae, Curculionidae, Buprestidae, distribution, conifers, Germany

### **Einleitung**

Die Gattung *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 umfaßt nach heutigem Wissensstand ca. 50 Arten (HUNT, 1993), die hauptsächlich in Nordamerika, Europa und Asien verbreitet sind. Die meisten von ihnen sind Holzbewohner, haben phoretische Beziehungen zu holz- und rindenbrütenden Insekten und ernähren sich mykophag. Nur wenige Arten sind zu phytophager Lebensweise befähigt. Der größte Teil der holzbewohnenden Arten lebt in Nadelgehölzen, in denen auch zahlreiche andere Nematodenarten vorkommen. Der bekannteste Vertreter der Gattung *Bursaphelenchus* ist der Kiefernholznematode, *B. xylophilus* (Steiner and Buhner, 1934) Nickle, 1970, der von seiner vermutlichen Heimat Nordamerika mit Holz nach Ostasien verschleppt wurde, dort in einigen Ländern (Japan, China, Korea) epidemisch auftritt und als Verursacher der Kiefernwelke enorme Verluste in Kiefernwäldern verursacht (MAMIYA, 1988). Er wird in allen Verbreitungsgebieten durch Cerambyciden der Gattung *Monochamus* übertragen. *B. xylophilus* ist ein Quarantäneorganismus der Eu-

ropäischen Gemeinschaften, und zur Verhinderung seiner Einschleppung wurden Anforderungen für zu importierendes Koniferenholz erlassen (Richtlinie 77/93/EEG).

Ein morphologisch und biologisch naher Verwandter des *B. xylophilus* ist die eurasisch verbreitete Art *B. mucronatus* Mamiya and Enda, 1979, die ebenfalls durch *Monochamus*-Arten übertragen wird. Während in Europa keine Schädigung dieses Nematoden bekannt ist und er auch in Japan als höchstens schwach pathogen eingeschätzt wird (MAMIYA and ENDA, 1979), wird er im Fernen Osten Rußlands verdächtig, Bäume zum Absterben zu bringen (KULINICH et al., 1994). Vereinzelt Berichte über eine pathogene Wirkung dieser Art auf *Pinus thunbergii* und *P. densiflora* gibt es auch aus China und Japan (KISHI, 1995), jedoch war *B. mucronatus* weniger pathogen als *B. xylophilus*. Auch Inokulationsexperimente zeigten, daß *B. mucronatus* unter bestimmten Bedingungen pathogen sein kann (SCHAUER-BLUME, 1990; BAKKE et al., 1991; BRAASCH, 1996). BRAASCH et al. (1998) demonstrierten in zahlreichen Inokulationsversuchen nicht nur das phytopathogene Potential von *B. mucronatus*, sondern auch die Fähigkeit des insbesondere im südeuropäischen Raum weit verbreiteten *B. sexdentati* Rühm, 1960, junge Koniferenpflanzen zum Absterben zu bringen.

Von RÜHM (1956, 1960) wurden aus Westdeutschland 8 in Nadelgehölzen vorkommende *Bursaphelenchus*-Arten beschrieben. 3 weitere Nadelholz bewohnende Arten wurden von FUCHS (1930, 1937) beschrieben und von RÜHM (1956) erneut in Deutschland nachgewiesen. Seitdem hat es bis zum Ende der achtziger Jahre in Deutschland keine Untersuchungen mehr zu Holz nematoden gegeben. Der Nachweis von *B. xylophilus* als Verursacher der Kiefernwelke in Japan Ende der siebziger Jahre lenkte auch in Deutschland das Interesse wieder auf diese biologisch interessante Nematodengruppe. SCHAUER-BLUME und STURHAN (1989) untersuchten in Westdeutschland Laub- und Nadelgehölze und fanden in Laubgehölzen den ebenfalls von RÜHM (1956) beschriebenen *B. fraudulentus*. BRAASCH (1991) wies erstmals in Deutschland an *Pinus sylvestris* die aus Japan beschriebene Art *B. mucronatus* Mamiya and Enda, 1979 nach.

Alle in Bäumen lebenden *Bursaphelenchus*-Arten werden, soweit bekannt, von holz- und rindenbrütenden Insekten während der Eiablage oder beim Reifefraß übertragen. Die häufigsten Vektoren sind Borkenkäfer, in einigen Fällen Bockkäfer, Rüsselkäfer und Prachtkäfer, in Einzelfällen Vertreter anderer Käferfamilien, z. B. der Nitiduliden (HAGLEY, 1963). Die Dauerstadien der Nematoden werden von den Käfern in der Regel unter den Flügeldecken, in den Intersegmentalhäuten des Thorax und Abdomens oder in den Tracheen getragen. Über die Biologie der *Bursaphelenchus*-Arten ist mit Ausnahme von *B. xylophilus* und *B. mucronatus* wenig bekannt.

Wiederholt sind auch andere *Bursaphelenchus*-Arten als *B. xylophilus* oder *B. mucronatus* in welkenden Nadelgehölzen festgestellt und einer ursächlichen Rolle dabei verdächtigt worden, z. B. *B. leoni* (PHILIS, 1996), ohne daß jedoch ein Pathogenitätsnachweis erfolgte. Manche Vektoren befallen als Sekundärschädlinge nur stark geschwächte Bäume, wo auch einige mykophag lebende *Bursaphelenchus*-Arten die geeigneten Lebensvoraussetzungen finden. Von SCHMUTZENHOFER (1981) wird allerdings über eine nicht beschriebene *Bursaphelenchus*-Art berichtet, die möglicherweise einen Anteil am Tannensterben der achtziger Jahre in Österreich hat.

Im Rahmen eines von der EU geförderten Forschungsprojektes zur Risikoanalyse mit dem Kiefernholznematoden verwandter *Bursaphelenchus*-Arten (RTD-Programm, FAIR CT 95-0083) erfolgte in Deutschland seit 1996 eine Erhebung zum Auftreten von *Bursaphelenchus*-Arten in Nadelgehölzen. Diese basiert auf der Untersuchung von Holzproben geschädigter Bäume

und von bekannten oder potentiellen Vektorinsekten. In vorliegender Arbeit wird über die festgestellten Arten und ihre Verbreitung berichtet. Da die Beschreibung der in den dreißiger und fünfziger Jahren in Deutschland nachgewiesenen *Bursaphelenchus*-Arten mangelhaft ist und kein Typenmaterial existiert, ist die taxonomische Zuordnung einiger Arten schwierig.

Molekularbiologische Techniken haben sich in den letzten Jahren als wertvolle Hilfsmittel bei der Nematoden-Taxonomie erwiesen (JONES et al., 1997). Durch Amplifikation der ribosomalen DNA mittels PCR werden DNA-Fragmente erhalten, die nach Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen artspezifische Subfragment-Muster liefern. Mit dieser als ITS-RFLP-Analyse bezeichneten Methode sind bei verschiedenen Nematodengattungen brauchbare Kriterien zur Artbestimmungen erhalten worden, z. B. bei *Meloidogyne* (ZIJLSTRA et al., 1995; SCHMITZ et al., 1998) und *Bursaphelenchus* (HOYER et al., 1998). In der vorliegenden Untersuchung wurden für alle morphologisch determinierten *Bursaphelenchus*-Arten charakteristische ITS-RFLP-Fragmentmuster etabliert, die eine Zuordnung neuer Isolate zu den einzelnen Arten erleichtern.

## Material und Methoden

Holzproben von Koniferen aus Waldbeständen wurden vorwiegend im Jahr 1996, in geringerem Umfang 1997 und 1998 in den in Tabelle 1 angeführten deutschen Ländern entnommen, aus der auch die Anzahl untersuchter Proben pro Land und die untersuchten Baumarten ersichtlich sind. Die Probenahme erfolgte mittels Säge im unteren, mittleren und oberen Stammbereich geschädigter bis frisch abgestorbener Bäume unterschiedlichen Alters von jeweils 10 Bäumen pro Standort. Dabei wurden ca. 5 cm dicke Scheiben aus dem Stamm geschnitten und Sektoren von diesen gewonnen. Die Holzstücke von 10 standortgleichen Bäumen wurden mit einer Labormühle zerkleinert und zu einer Mischprobe vereinigt, von der 300 g mit Hilfe der modifizierten Baermann-Trichter-Methode (48 Stunden Extraktionszeit) auf das Vorkommen von Nematoden untersucht wurden. In wenigen Fällen, bei denen eine Probenahme mittels Zersägen der Stämme nicht möglich war, erfolgte die Entnahme von Bohrkernen mittels eines forstlichen Zuwachsbohrers oder das Ausstanzen von Holz-Rinde-Zylindern mit Hilfe eines Locheisens.

Morphologisch determinierte *Bursaphelenchus*-Arten wurden an *Botrytis*-Kulturen auf Malzagar vermehrt und der molekularbiologischen Untersuchung zugeführt. Die mikroskopische Bestimmung von *Bursaphelenchus*-Arten anhand morphologischer Merkmale geschieht vorrangig mittels der Form der Spikula der

Tab. 1. Anzahl auf das Vorkommen von *Bursaphelenchus* untersuchter Holzproben und Baumarten in deutschen Ländern

Land	Anzahl Proben	Baumarten
Baden-Württemberg	3	<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Picea abies</i>
Brandenburg	44	<i>P. sylvestris</i> , <i>P. abies</i>
Bayern	24	<i>P. abies</i> , <i>Abies alba</i>
Hessen	12	<i>P. sylvestris</i>
Mecklenburg-Vorpommern	11	<i>P. sylvestris</i> , <i>Larix decidua</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i>
Niedersachsen	1	<i>L. decidua</i>
Nordrhein-Westfalen	1	<i>Pinus thunbergii</i>
Sachsen	19	<i>P. sylvestris</i> , <i>P. abies</i> , <i>Larix kaempferi</i>
Sachsen-Anhalt	6	<i>P. sylvestris</i>
Schleswig-Holstein	18	<i>P. sylvestris</i> , <i>P. abies</i>
Thüringen	36	<i>P. sylvestris</i> , <i>P. abies</i>
<b>Summe</b>	<b>175</b>	

Männchen und des Schwanzendes der Weibchen, der Form der kleinen, das Schwanzende der Männchen umfassenden Bursa sowie dem Vorhandensein oder Fehlen einer Vulvaklappe der Weibchen unter Einbeziehung morphometrischer Werte.

Die Gewinnung von Insekten zur Vektoruntersuchung erfolgte durch Absammeln von geschlagenen Stämmen und Restholz an Stellen frischen Einschlags, an stehenden Bäumen in geschädigten Beständen, durch Ausschluß von überliegendem Holz in Käfigen und mit Hilfe von Pheromonfallen für Buchdrucker (*Ips typographus*) und Kupferstecher (*Pityogenes chalcographus*) sowie Lockfallen mit  $\alpha$ -Pinen und Äthanol (IKEDA and ODA, 1981). Alle Untersuchungen wurden in Absprache mit den zuständigen Forstämtern und mit deren Unterstützung durchgeführt.

Zur DNA-Extraktion wurden jeweils 1 bis 50 Tiere eines Isolates ohne vorherige Trennung nach Geschlecht oder Entwicklungsstadium eingesetzt. Die Tiere wurden in ein Eppendorf-Gefäß mit Wasser überführt und für 2 min bei  $9000 \times g$  in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der wäßrige Überstand wurde größtenteils mit einer Pipette abgesaugt und Wasserreste mit Hilfe eines Vakuumkonzentrators entfernt. Mit Hilfe eines Mikropipettens (Eppendorf) oder Glasstabs wurde das noch feuchte Nematodensediment homogenisiert. Die DNA-Isolierung erfolgte anschließend gemäß dem etwas modifizierten Protokoll des Dynal DNA Direct System I Kit. Das Homogenat wurde mit magnetischen Partikeln in Lysispuffer für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Separation des Magnetpartikel-DNA-Komplexes von der Pufferlösung erfolgte durch Einstellen des Gefäßes in einen Magnethalter (Dynal MPC-E-1). Der Komplex wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und zur Ablösung der DNA in 10 bis 30  $\mu$ l Resuspensionspuffer resuspendiert und 5 min bei  $65^\circ\text{C}$  inkubiert. Eine Abtrennung der magnetischen Partikel von dem DNA-Extrakt war nicht notwendig, da die PCR durch die Partikel nicht behindert wurde. Zur fluorimetrischen Konzentrationsbestimmung der DNA mußten die Magnetpartikel allerdings durch Zentrifugation entfernt werden. Die DNA-Konzentration wurde nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258 mit einem DNA-Fluorometer DyNA Quant 200 (Pharmacia) gemessen.

Die PCR wurde in 50  $\mu$ l Reaktionsvolumina mit einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler durchgeführt. Die Ansätze enthielten 2 U Taq DNA-Polymerase (Stratagene), 10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,6  $\mu$ M forward Primer 5'-CG-TAACAAGGTAGCTGTAG-3' nach FERRIS et al. (1993), 0,6  $\mu$ M reverse Primer 5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3' nach VRAIN (1993), 0,1 mM dNTP's (Boehringer Mannheim) und mindestens 2 ng DNA. Das PCR-Programm umfaßte eine Initialdenaturierung bei  $94^\circ\text{C}$  für 2 min, 40 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei  $94^\circ\text{C}$ , 1 min annealing bei  $55^\circ\text{C}$  und 2 min

Extension bei  $72^\circ\text{C}$ . Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Extension von 5 min zur Vervollständigung partieller DNA-Stränge. 5  $\mu$ l jeder Probe wurden anschließend zur Abschätzung der notwendigen Menge an ITS-Fragment für die Restriktionsanalyse in einem 1,8%-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, die amplifizierte DNA mit 1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in Wasser für 30 min angefärbt und mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Die amplifizierte rDNA wurde mit den 5 Restriktionsendonukleasen *Rsa* I, *Hae* III, *Msp* I, *Hinf* I und *Alu* I (Gibco) fragmentiert. Hierzu wurden 5 bis 8  $\mu$ l der PCR-Ansätze mit der optimalen Pufferlösung (Gibco-Puffer 1 bzw. 2) und 4 U des jeweiligen Restriktionsenzym für mindestens 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Größenanalyse der erhaltenen Restriktionsfragmente erfolgte durch Gelelektrophorese in einem 2,5%-Agarose-Gel. Die Fragmente wurden mit 1  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in Wasser für 30 min angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

## Ergebnisse

Insgesamt wurden 11 *Bursaphelenchus*-Arten in Deutschland gefunden (Tab. 2), davon 9 in Holzproben, von denen *B. hoffmanni* Braasch, 1998, *B. hellenicus* Skarmoutsos, Braasch and Michalopoulou, 1998 und *B. borealis* Korenchenko, 1980 erstmals in Deutschland nachgewiesen wurden. *B. spec.* DE-14(w) ist eine an anderer Stelle neu zu beschreibende Art. *B. leoni* Baujard, 1980 wurde nur am Vektor, *B. fungivorus* Franklin and Hooper, 1962 in rindenhaltigem Pflanzsubstrat festgestellt. Von 175 untersuchten Holzproben (Sammelproben von jeweils 10 Bäumen) enthielten 29 Proben *Bursaphelenchus*-Arten, von denen 13 Fundorte die weitaus häufigste Art *B. mucronatus* betrafen. An 3 weiteren Fundorten wurde *B. mucronatus* in vorausgegangenen Untersuchungen in Deutschland festgestellt. Tabelle 2 weist den prozentualen Anteil der Funde der einzelnen Arten bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Holzproben und die befallenen Baumarten aus. Der in Deutschland bislang nicht nachgewiesene gefährliche Quarantäneschädling *B. xylophilus* wurde nicht festgestellt.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Untersuchung von 5984 holz- und rindenbrütenden Insekten auf ihre Assoziation mit Nematoden zusammengefaßt. Während 38 % der untersuchten 13 Cerambyciden-Arten, 89 % der 18 Scolytiden-Arten, beide untersuchten Curculioniden-Arten und eine der beiden untersuchten Buprestiden-Arten Nematoden enthielten, konnten nur bei 5 Käferarten infolge Auszucht der Adulten aus den Dauerlarven *Bursaphelenchus*-Arten eindeutig festgestellt werden. Nachfolgend werden die insgesamt festgestellten Arten mit kurzen Erläuterungen angeführt.

Tab. 2. In Deutschland 1996–1998 festgestellte *Bursaphelenchus*-Arten (175 Holzproben von je 10 Bäumen)

<i>Bursaphelenchus</i> -Art	Anzahl Proben mit <i>Bursaphelenchus</i>	Prozentsatz kontaminierter Holzproben	Befallene Baumart
<i>B. mucronatus</i>			
Ostasiatischer Genotyp	2	1%	<i>Picea abies</i>
Europäischer Genotyp	11	6%	<i>Pinus sylvestris</i> , <i>P. abies</i> , <i>Larix decidua</i>
<i>B. fraudulentus</i>	1	0,6%	Koniferen-Sägemehl
<i>B. sexdentati</i>	3	2%	<i>P. sylvestris</i>
<i>B. poligraphi</i>	1	0,6%	<i>P. abies</i>
<i>B. eggersi</i>	2	1%	<i>P. sylvestris</i>
<i>B. leoni</i>	(1)	–	(nur am Vektor)
<i>B. hoffmanni</i>	2	1%	<i>P. abies</i>
<i>B. hellenicus</i>	1	0,6%	<i>P. sylvestris</i>
<i>B. borealis</i>	2	1%	<i>P. sylvestris</i>
<i>B. spec.</i> DE-14(w)	2	1%	<i>P. abies</i> , <i>P. sylvestris</i>
<b>Summe: 10 Arten</b>	<b>27</b>	<b>15%</b>	

Tab. 3. Ergebnisse der Untersuchung holz- und rindenbrütender Käfer auf phoretische Beziehung zu Nematoden

Käfer-Art	Anzahl unter-suchter Individuen	Nematoden-Phoresie B. = Bursaphelenchus + = andere Nematoden - = keine Nematoden
<b>Cerambycidae</b>		
<i>Acanthocinus aedilis</i>	3	-
<i>Acanthocinus griseus</i>	5	+
<i>Brachyleptura maculicornis</i>	2	-
<i>Caenoptera minor</i>	2	-
<i>Criocephalus rusticus</i>	54	+
<i>Leptura rubra</i>	46	-
<i>Leptura fulva</i>	1	+
<i>Leptura spec.</i>	5	-
<i>Monochamus galloprovincialis</i>	28	<i>B. mucronatus</i>
<i>Pogonocherus fasciculatus</i>	2	-
<i>Rhagium inquisitor</i>	78	-
<i>Spondylus buprestoides</i>	25	+
<i>Tentobium castaneum</i>	14	-
<b>Scolytidae</b>		
<i>Dryocoetes autographus</i>	104	<i>B. leoni</i> <i>B. borealis</i>
<i>Hylastes ater</i>	43	+
<i>Hylastes cunicularius</i>	17	+
<i>Hylastes opacus</i>	5	-
<i>Hylurgops palliatus</i>	51	<i>B. eggersi</i> <i>B. poligraphi</i>
<i>Ips acuminatus</i>	52	+
<i>Ips cembrae</i>	20	+
<i>Ips sexdentatus</i>	716	+
<i>Ips typographus</i>	3239	+
<i>Orthotomicus longicollis</i>	2	-
<i>Orthotomicus proximus</i>	67	+
<i>Pityophthorus glabratus</i>	7	+
<i>Pityogenes bidentatus</i>	15	+
<i>Pityogenes chalcographus</i>	1088	+
<i>Pityogenes quadridens</i>	3	+
<i>Polygraphus poligraphus</i>	46	<i>B. poligraphi</i>
<i>Tomicus piniperda</i>	31	+, <i>B. sexdentati</i>
<i>Xyloterus lineatus</i>	46	+
<b>Curculionidae</b>		
<i>Hyllobius abietis</i>	102	+
<i>Pissodes pini</i>	32	+
<b>Buprestidae</b>		
<i>Chrysobotrys solieri</i>	2	-
<i>Phaenops cyanea</i>	31	+

***B. mucronatus* Mamiya und Enda, 1979**

*B. mucronatus* unterscheidet sich morphologisch von *B. xylophilus* durch das Vorhandensein eines Fortsatzes (Mukro) am weiblichen Schwanzende. Nach molekularbiologischen Untersuchungen (BRAASCH et al., 1995; HOYER et al., 1998) gibt es zwei morphologisch nur schwierig unterscheidbare Genotypen: einen „ostasiatischen“ mit dem bekannten Verbreitungsgebiet Japan und China und einen „europäischen“, dessen Verbreitungsgebiet sich von Europa über Sibirien bis zum Fernen Osten Rußlands erstreckt. Die meisten deutschen Herkünfte entsprechen dem europäischen Typ, während 2 Isolate von Fichte aus Bayern (Zusmarshausen) bzw. Thüringen (Bad Salzungen) den ostasiatischen Typ repräsentieren, wobei es sich um die bisher einzigen Fundorte in Europa handelt. Der europäische Genotyp kommt in Deutschland sowohl an Kiefer als auch an Fichte vor und wurde in Mecklenburg (2 Fundorte), Brandenburg (4 Fundorte), Sachsen-Anhalt (1 Fundort), Sachsen (1 Fundort), Thüringen (2 Fundorte), Niedersachsen (1 Fundort), Bayern (2 Fundorte) festgestellt. Am Fundort Zusmarshausen/Bayern wurden beide Genotypen in nicht weit voneinander entfernten Fichten gefunden.

*B. mucronatus* konnte in Deutschland erstmals an dem bekannten Vektor *Monochamus galloprovincialis* festgestellt werden. Die Käfer stammten aus einem Gebiet in Brandenburg (Lieberose), das 1996 infolge des Ausbleibens von Bekämpfungsmaßnahmen gegenüber anderen Kieferschädlingen ein stärkeres Auftreten von *Monochamus* aufwies. Aus anderen Gebieten Deutschlands konnten keine *Monochamus*-Arten erlangt werden.

***B. fraudulentus* Rühm, 1956 (J. B. Goodey, 1960)**

*B. fraudulentus* wurde in Koniferen-Sägemehl aus dem Sägewerk Jochum bei Zusmarshausen in Bayern gefunden. Er gehört morphologisch zum engeren Verwandtschaftskreis von *B. xylophilus* und *B. mucronatus*. Die Männchen unterscheiden sich kaum von *B. mucronatus* und *B. xylophilus*, während die Weibchen einen kürzeren Mukro als *B. mucronatus* am Schwanzende tragen. Die Weibchen von *B. xylophilus* besitzen dagegen ein abgerundetes Schwanzende. Alle 3 Arten weisen im weiblichen Geschlecht eine deutliche Vulvaklappe auf. *B. fraudulentus* war bisher als Bewohner von Laubgehölzen bekannt. Die Artzugehörigkeit wurde durch die ITS-RFLP-Methode im Vergleich zu Referenzproben aus Laubgehölzen nachgewiesen.

***B. sexdentati* Rühm, 1960**

Die in Deutschland festgestellten Populationen entsprechen morphologisch der Originalbeschreibung von RÜHM (1960), die mit den später erfolgten Beschreibungen von *B. naujaci* Baujard 1980 und *B. bakeri* Rühm, 1964 synonymisiert wurde (HUNT, 1993). Die Weibchen besitzen ein stumpf gerundetes Schwanzende, während in Südeuropa häufig Populationen der gleichen Art mit konisch-gerundetem Schwanz vorkommen. Durch die charakteristische Form der Spikula, die relativ hohen Maße für Körpergröße, Mundstachel und Spikula, das kräftige spitze Schwanzende der Männchen und die Vulvaklappe der Weibchen läßt sich diese Art relativ leicht determinieren.

Es handelt sich um Funde einzelner Exemplare an *Pinus sylvestris* aus Storkow und Jatznik in Brandenburg und Dobereschütz in Sachsen sowie um die Feststellung einer Population im Frühjahr 1999 in frisch angelegten Fraßgängen des Borkenkäfers *Tomicus piniperda* in 20- und 30jährigen *P. sylvestris* in einem Waldstück bei Caputh nahe Potsdam. Dauerlarven des Nematoden konnten auch von *T. piniperda* isoliert werden.

***B. poligraphi* Fuchs, 1937**

*B. poligraphi* ist eine morphologisch *B. sexdentati* nahestehende Art mit sehr ähnlicher Spikula, unterscheidet sich jedoch von dieser hauptsächlich durch das nicht so lang und spitz ausgezogene Schwanzende der Männchen und die geringeren Maße für Mundstachel und Spikula. Der Condylus der Spikula ist dorsalwärts gebogen. Die Tatsache, daß das befallene Fichtenholz von Torfhaus/Harz mit dem von FUCHS (1937) und RÜHM (1956) angegebenen Vektor *Polygraphus poligraphus* (Scolytidae) befallen war und die Käfer Dauerlarven des Nematoden aufwiesen, sowie Unterschiede zu *B. sexdentati* in den ITS-RFLP-Mustern waren Anlaß, diesen Fund der Art *B. poligraphi* zuzuordnen. Es zeigten sich jedoch auch in den Restriktionsfragment-Mustern Ähnlichkeiten, die eine enge Verwandtschaft beider Arten andeuten. Das gleiche Holzstück war auch von dem Borkenkäfer *Hylurgops palliatus* befallen, der ebenfalls Dauerlarven des Nematoden trug.

***B. eggersi* Rühm, 1956 (J. B. Goodey, 1960)**

Diese Art wurde 1996 vereinzelt im Forstamtbereich Eberswalde (Breitelage) an Kiefer sowie an Fichtenholz aus dem Sägewerk Spiegelau in Bayern gefunden. In einem Kiefernbestand



bei Potsdam traten im April 1999 Dauerlarven dieser Art auf dem Borkenkäfer *Hylurgops palliatus* und Larven und Adulte des Nematoden in dessen frisch angelegten Fraßgängen auf. Es handelt sich um sehr große Tiere (Längen bis über 1 mm) mit charakteristisch geformter Spikula und konisch gekrümmtem Schwanzende der Weibchen, denen eine Vulvaklappe fehlt.

*Bursaphelenchus hofmanni* Braasch, 1998

*B. hofmanni* wurde an *Picea abies* bei Zusmarshausen (Bayern) und Eisenach (Thüringen) gefunden. Es handelt sich um eine re-

lativ kleine Art mit zierlicher Spikula. Über den Vektor ist nichts bekannt.

*B. hellenicus* Skarmoutsos, Braasch und Michaloupolou, 1998

Es gibt nur einen Fundort von dieser aus Griechenland beschriebenen Art an *Pinus sylvestris* neben dem Holzplatz Wriezen in Brandenburg, auf dem in den siebziger und achtziger Jahren umfangreiche Holzimporte aus Rußland lagerten. Durch die charakteristische Form der Spikula mit stark verlängertem, schlan-

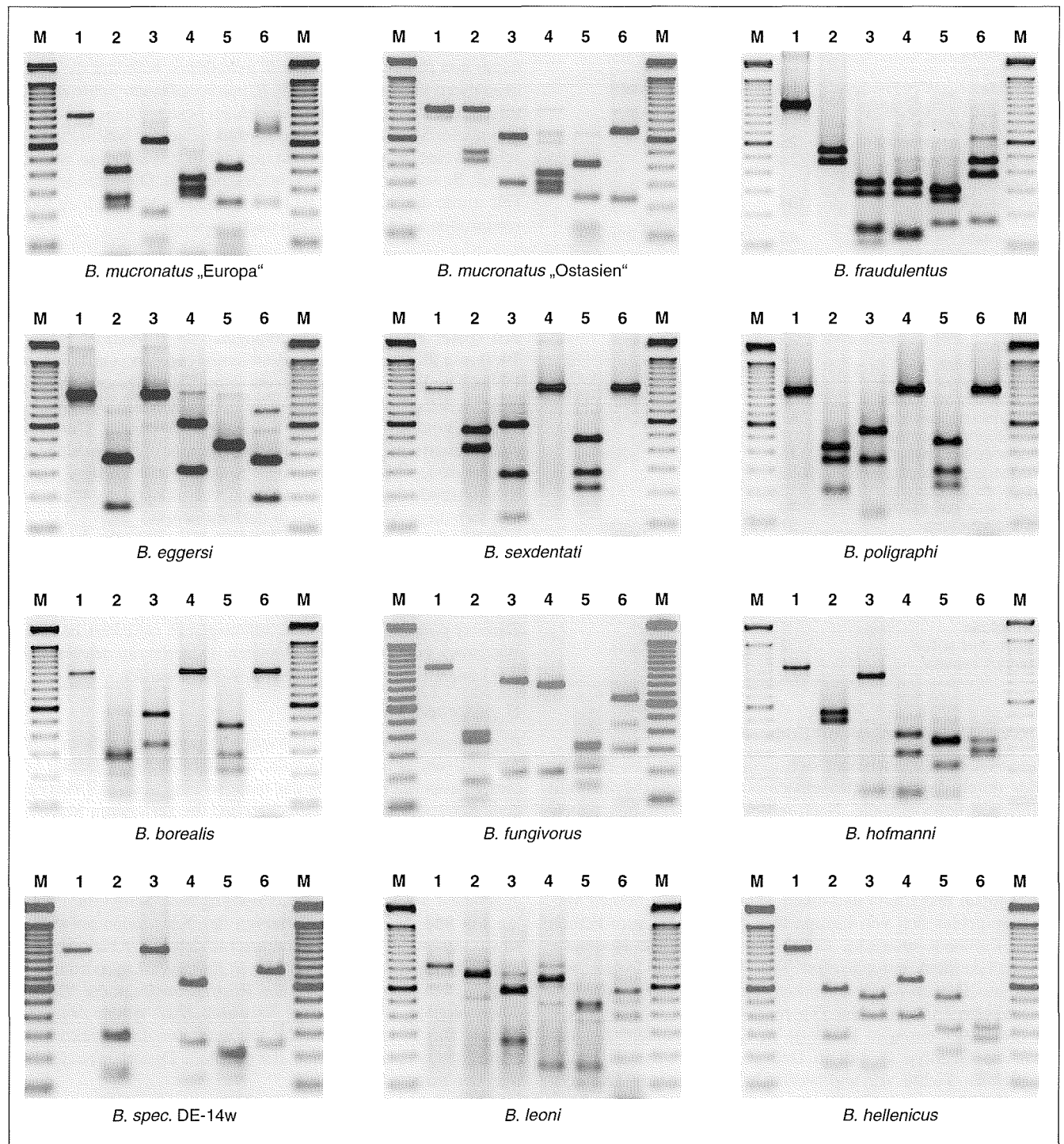


Abb. 1: ITS-RFLP-Fragmentmuster für in Deutschland gefundene *Bursaphelenchus*-Arten. M: DNA-Längenmaßstab (100 bp ladder, Gibco); 1: rDNA-Amplifikat; 2-6: DNA-Fragmente nach Spaltung der amplifizierten rDNA mit *Rsa* I, *Hae* III, *Msp* I, *Hinf* I, bzw. *Alu* I.

Tab. 4. Restriktionsfragmentgrößen der amplifizierten rDNA von 11 in Deutschland vorkommenden Arten der Gattung *Bursaphelenchus* und einem *B. xylophilus*-Isolat aus den USA.

Arten	ITS-PCR-Produkt (bp)	Restriktionsfragmente (bp) mit				
		<i>Rsa</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Alu</i> I
<i>B. xylophilus</i> US 15	950	510	<b>730</b>	<b>570</b>	<b>270</b>	<b>460</b>
		420	<b>220</b>	<b>380</b>	<b>250</b>	<b>250</b>
					<b>140</b>	<b>140</b>
<i>B. mucronatus</i> „Europa“	950	<b>410</b>	<b>620</b>	370	430	700
		<b>290</b>	<b>220</b>	300	250	250
		<b>230</b>	<b>110</b>	280	130	
					90	
<i>B. mucronatus</i> „Ostasien“	950	520	<b>620</b>	370	430	700
		410	<b>330</b>	300	250	250
				280	130	
					90	
<i>B. fraudulentus</i>	1030	560	<b>340</b>	360	310	<b>470</b>
		470	<b>290</b>	290	260	<b>390</b>
			<b>150</b>	130	160	<b>180</b>
			<b>110</b>			
<i>B. borealis</i>	1000	<b>290</b>	<b>560</b>	1000	450	1000
		<b>220</b>	<b>350</b>		290	
		<b>130</b>	<b>120</b>		230	
<i>B. fungivorus</i>	1070	<b>410</b>	<b>860</b>	<b>820</b>	310	<b>680</b>
		<b>380</b>	<b>210</b>	<b>210</b>	280	<b>300</b>
		<b>180</b>			220	
		<b>120</b>			170	
<i>B. hofmanni</i>	1050	560	<b>910</b>	380	<b>350</b>	<b>360</b>
		490	<b>140</b>	300	<b>240</b>	<b>300</b>
				130	<b>120</b>	<b>280</b>
<i>B. spec. DE-14w</i>	1020	<b>310</b>	1020	<b>630</b>	<b>230</b>	<b>760</b>
		<b>290</b>		<b>270</b>	<b>210</b>	<b>260</b>
		<b>170</b>		<b>120</b>	<b>180</b>	
		<b>140</b>			<b>130</b>	
<i>B. poligraphi</i>	980	<b>430</b>	<b>530</b>	980	470	980
		<b>340</b>	<b>350</b>		290	
		<b>210</b>			220	
<i>B. sexdentati</i>	1000	<b>570</b>	<b>600</b>	1000	490	1000
		<b>440</b>	<b>300</b>		300	
			<b>120</b>		230	
<i>B. eggersi</i>	950	<b>380</b>	950	<b>620</b>	470	<b>380</b>
		<b>180</b>		<b>330</b>		<b>190</b>
<i>B. leoni</i>	850	<b>790</b>	<b>590</b>	<b>690</b>	<b>480</b>	590
			<b>260</b>	<b>160</b>	<b>160</b>	490
						400
						300
<i>B. hellenicus</i>	1080	<b>610</b>	530	690	<b>520</b>	340
		<b>290</b>	390	390	<b>320</b>	280
		<b>180</b>	160		<b>220</b>	180
						120

1. Zur Artbestimmung geeignete Fragmentmuster sind durch Fettdruck hervorgehoben

2. Für *B. xylophilus* und *B. mucronatus* wurden Sequenzdaten der rDNA publiziert (IWAHORI et al., 1998)

kem Condylus ist *B. hellenicus* leicht von anderen Arten abgrenzbar.

#### *B. borealis* Korenchenko, 1980

Bei dieser Art handelt es sich um eine morphologisch und entsprechend den ITS-RFLP-Mustern von den bisher aus Deutschland bekannten *Bursaphelenchus*-Arten abweichende Art. Sie wurde aus Kiefernholz von Eggesin (Mecklenburg-Vorpommern) und aus Fichtenholz von Bad Salzungen (Thüringen) extrahiert. Außerdem wurden ihre Dauerlarven auf einem in Lockfallen in einem Kiefernbestand in Caputh bei Potsdam gefangenen Borkenkäfer der Art *Dryocoetes autographus* festgestellt.

Der Condylus der Spikula ist bei dieser Art deutlich nach hinten gekrümmt, wodurch Ähnlichkeit mit der aus Rußland be-

schriebenen Art *B. borealis* Korenchenko, 1980 und mit der aus Deutschland beschriebenen Art *B. eidmanni* Rühm, 1956 besteht. *B. eidmanni* besitzt jedoch einen im weiblichen Geschlecht viel längeren und dünneren Schwanz (RÜHM, 1956). Die morphometrischen Werte stimmen weitgehend mit denen von *B. borealis* überein. Auch die Form des weiblichen Schwanzendes, das Vorhandensein einer Vulvaklappe, das etwas gedrungene männliche Schwanzende und die zweigipflige Form der Bursa stimmen gut mit den Merkmalen von *B. borealis* überein. Es war leider nicht möglich, aus dem Helminthologischen Institut in Moskau dort vorhandenes Typenmaterial von *B. borealis* auszuleihen. Da sich diese Art nicht durch besonders augenfällige Merkmale heraushebt, ist die Determination mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Die ITS-RFLP-Analyse weist für die deutschen Isolate ein

charakteristisches Muster aus, an dem deren taxonomische Zuordnung später überprüft werden kann. Bei der Untersuchung russischen Importholzes in Deutschland wurde die gleiche Art ebenfalls in Koniferenholz gefunden (BRAASCH et al., 1999).

#### *B. leoni* Baujard, 1980

*B. leoni* ist eine typisch mediterrane Art. Sie scheint in Mitteleuropa selten zu sein und wurde nicht in Holzproben in Deutschland gefunden. Die ITS-RFLP-Muster von Dauerlarven, die von Borkenkäfern der Art *Dryocoetes autographus* aus Süddeutschland (Zusmarshausen) isoliert wurden, entsprechen bis auf ganz geringe Abweichungen dieser Art. Eine Zucht der Imagines aus den Dauerlarven auf *Botrytis cinerea* gelang nicht; die Zucht im Labor ist generell bei *B. leoni* recht schwierig.

#### *B. spec.* DE-14(w)

Diese unbekannt *Bursaphelenchus*-Art wurde sowohl in Bayern (Rauheck) im Fraßmehl von *Ips typographus* an Fichte als auch in einer 19jährigen unterdrückten Kiefer in einem Stangenholz-Bestand bei Caputh in Brandenburg gefunden. Die ITS-RFLP-Analyse bestätigte die Zugehörigkeit beider Isolate zur gleichen Art. RÜHM (1956) fand im Fraßmehl von *I. typographus* die Art *B. eidmanni*, die sich jedoch in der Form der Spikula und des weiblichen Schwanzendes sowie in den Maßen erheblich von dem Isolat DE-14(w) unterscheidet. Unter den aus Deutschland bekannten Arten ähnelt DE-14(w) am meisten *B. chitwoodi* Rühm, 1956, worauf besonders der bei einem Teil der weiblichen Tiere am Schwanzende vorhandene Mukro hinweist. Jedoch gibt es kein Typenmaterial dieser Art, und bei DE-14(w) ist der weibliche Schwanz stärker gekrümmt und variabel in der Form, die Spikula sind von abweichender Form und besitzen im Gegensatz zu *B. chitwoodi* einen deutlichen Cucullus. Die Bursa ist abweichend von dieser Art in der Regel zweigipflig. Besonders große Ähnlichkeit besteht zu der amerikanischen Art *B. corneolus* Massey, 1966. Das Studium von Paratypen dieser Art ergab jedoch, daß es sich nicht um *B. corneolus* handelt. Das Isolat DE-14(w) wird in gesonderter Publikation ausführlich beschrieben.

#### *B. fungivorus* Franklin and Hooper, 1962

Obwohl diese Art in Deutschland nicht in Nadelholz gefunden wurde, sondern in großer Anzahl in einem rindenhaltigen Pflanzsubstrat in einem Gewächshaus in Sachsen auftrat, soll sie hier mit erwähnt werden, da sie mehrfach in Importen von Nadelholzrinde festgestellt wurde und offenbar ein Nadelholzbewohner ist. Nähere Informationen zu dieser Art werden separat publiziert.

Die Populationsdichte der festgestellten Arten war meist zu gering, um auf eine Schädigung unter den gegebenen Bedingungen schließen zu können. Die höchsten Populationsdichten wies *B. spec.* DE-14(w) sowohl in Fichte als auch in Kiefer auf (ca. 400 Tiere/g Holz). Die meisten *Bursaphelenchus*-Arten sind auf Pilzkulturen kultivierbar. Vermehrungszuchten deutscher Isolate an *B. cinerea* auf Malzagar, zum Teil als geographisch unterschiedliche Isolate einzelner Arten, konnten von allen genannten Arten außer von *B. leoni* und *B. hellenicus* angelegt werden.

Die Ergebnisse der ITS-RFLP-Analysen sind in Abbildung 1 und in Tabelle 4 wiedergegeben. Durch Amplifikation des ITS-Bereichs der rDNA mit den von FERRIS et al. (1993) und VRAIN (1993) beschriebenen Primern wurde ein DNA-Fragment erhalten, das bei den untersuchten Arten im Größenbereich von 850 bis 1080 bp lag. Zur Aufdeckung von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen wurden die bereits in einer früheren Untersuchung (HOYER et al., 1998) verwendeten Restriktionsendonucleasen eingesetzt. Die mit diesen Enzymen erhaltenen Re-

striktionsfragmente sind in Tabelle 4 aufgelistet. Im Vergleich zu den in Deutschland festgestellten Arten werden die Restriktionsfragmente einer amerikanischen Population des in Deutschland nicht festgestellten Quarantäneschädlings *B. xylophilus* gezeigt. Für die einzelnen Arten spezifische Fragmentmuster wurden jeweils mit einem oder mehreren der verwendeten Enzyme erhalten. Die beste Artdifferenzierung wurde mit den Enzymen *Hae* III (10 Arten) und mit *Rsa* I (8 Arten) erzielt.

## Diskussion

Außer den in vorliegenden Untersuchungen nachgewiesenen Arten sind nach RÜHM (1956) und FUCHS (1930, 1937) von Koniferen aus Deutschland 9 weitere *Bursaphelenchus*-Arten bekannt: *B. chitwoodi* Rühm, 1956, *B. cryphali* Fuchs, 1930, *B. eidmanni* Rühm, 1956, *B. idius* Rühm, 1956, *B. incurvus* Rühm, 1956, *B. nuesslini* Rühm, 1956, *B. piniperdae* Fuchs, 1937, *B. sachsii*, Rühm, 1956 und der von Fuchs, 1930 als *Parasitaphelenchus* beschriebene *B. conjunctus* (Fuchs, 1930) Andrassy, 1958. Sie wurden alle in Süd- und Südwestdeutschland gefunden, während der Schwerpunkt vorliegender Untersuchungen in Ostdeutschland lag. Die Arten *B. cryphali* Fuchs, 1930 und *B. conjunctus* Fuchs, 1930 wurden durch HUNT (1993) zu den Species inquirendae gestellt. Bezieht man diese mit ein, sind gegenwärtig aus Deutschland 20 Nadelholz bewohnende *Bursaphelenchus*-Arten bekannt.

Unter den Vektoren der in Deutschland vorkommenden *Bursaphelenchus*-Arten befinden sich einige Borkenkäfer, die als Primärschädlinge auftreten können, z. B. *Ips typographus*, *Pityogenes chalcographus*, *Cryphalus piceae*, *Pityokteines chalcographus* und *Tomicus piniperda*. Die durch solche Vektoren übertragenen *Bursaphelenchus*-Arten verdienen besondere Beachtung hinsichtlich einer möglichen Beteiligung am Schädgeschehen. Obwohl das phytopathogene Potential von *B. mucronatus* und *B. sexdentati* experimentell nachgewiesen wurde (BRAASCH et al., 1998), gibt es bisher in Deutschland keine Anhaltspunkte über die Schädigung von Koniferen durch *Bursaphelenchus*-Arten. Nach bisherigen Erkenntnissen sind für ein schädliches Auftreten des Kiefernholznematoden mittlere Juli/August-Temperaturen von mindestens 20 °C erforderlich. Die Langzeitwerte für Deutschland liegen durchweg unter diesen Temperaturen. Deshalb sind begrenzte Schäden durch wenige *Bursaphelenchus*-Arten allenfalls in sehr warmen und trockenen Jahren zu erwarten.

*B. mucronatus* ist nach vorliegenden Ergebnissen die in Nadelgehölzen am häufigsten anzutreffende *Bursaphelenchus*-Art in Deutschland. Von BRAASCH (1991) war sie bereits in Ostdeutschland nachgewiesen worden, während SCHAUER-BLUME und STURHAN (1989) berichteten, daß in 170 untersuchten Koniferen aus Westdeutschland *B. mucronatus* nicht festgestellt werden konnte. Obwohl aufgrund der ähnlichen Biologie davon ausgegangen werden muß, daß überall dort, wo *B. mucronatus* vorkommt, auch *B. xylophilus* einbürgerungsfähig ist, wurde dieser nicht festgestellt, was die bisherige Abwesenheit dieses gefährlichen Quarantäneschädlings in Deutschland bestätigt.

*B. mucronatus* wird wie *B. xylophilus* von *Monochamus*-Arten von Baum zu Baum übertragen. Die Schlußfolgerung ist naheliegend, daß die gegenwärtigen oder potentiellen Verbreitungsgebiete dieser beiden Arten innerhalb des Verbreitungsgebietes der *Monochamus*-Arten liegen müssen, deren Vorkommen in Europa an die Verbreitungsgebiete von *Picea* und *Pinus* gebunden ist. Es werden jedoch von beiden Arten auch Tanne und Lärche befallen. In Europa kommen an Koniferen 5 *Monochamus*-Arten vor (*M. sutor* L., *M. galloprovincialis* Oliv., *M. saltuarius* Gebl., *M. urussovi* Frich, *M. sartor* F.),

von denen nur die letztgenannte Art auf Europa beschränkt ist, während die anderen eurosibirische Arten sind, deren Verbreitungsgebiet sich bis nach Ostasien erstreckt (HELLRIGL, 1971). Für die Vorkommen von *B. mucronatus* an Kiefer im Flachland ist *M. galloprovincialis* der Überträger. Es ist anzunehmen, daß in den Mittelgebirgslagen Thüringens und Bayerns *M. sutor* als Vektor dient, der in Skandinavien bereits als solcher nachgewiesen wurde (MCNAMARA and STØEN, 1988; MAGNUSSON and SCHROEDER, 1989). Fichte wird nicht von *M. galloprovincialis* befallen. *M. sartor* kommt im Alpenbereich vor, wo er hauptsächlich subalpin an Fichte lebt. *M. saltuarius*, der Hauptüberträger von *B. mucronatus* in Japan, ist in Mitteleuropa selten und auf Gebirgsgebieten beschränkt. *M. urusovi* kommt in Deutschland nicht vor. Demnach sind für die Übertragung von *B. mucronatus* in Deutschland – wie in Skandinavien – *M. sutor* und *M. galloprovincialis* von Bedeutung, möglicherweise auch *M. saltuarius*. *B. mucronatus* wurde jedoch in Kiefernbeständen beobachtet, in denen es keine Anzeichen des Auftretens von *Monochamus* gab. Es ist ungeklärt, ob in Deutschland weitere Vektoren den Nematoden erfolgreich übertragen.

Entsprechend der schwankenden Populationsdynamik der Vektoren in Abhängigkeit von den Brutmöglichkeiten und der Witterung unterliegt das Auftreten der *Bursaphelenchus*-Arten sicherlich ebenfalls großen Schwankungen. Nach dem 2. Weltkrieg war infolge waldbaulicher Umstände z. B. das *Monochamus*-Problem vor allem in den skandinavischen Ländern, aber auch in Mittel- und Osteuropa zu einem vordringlichen Schädlingsproblem geworden, während es heute im allgemeinen in Deutschland keine größere Rolle spielt. *Monochamus*-Arten sind sekundäre Frischholzinsekten, können bei Massenauftritten jedoch auch zu Primärschädlingen werden. Reservoire ihres Bestandes sind Waldbrand- und Windwurfstellen sowie Gebiete mit Insektenkalamitäten. Die Vermehrung der *Bursaphelenchus*-Arten ist temperaturabhängig und wird durch Trockenstreß der Bäume gefördert. Eine intensivere Vermehrung führt dazu, daß die Vektoren mehr Nematoden tragen und verbreiten.

*B. fraudulentus* war bis auf 2 Funde aus Nordamerika an Kiefernen (BRAASCH et al., 1995) bisher nur in Laubgehölzen gefunden worden. Es besteht die Unsicherheit, ob nicht geringe Mengen Laubholz unter die Nadelholz-Sägemehl aus dem Sägewerk Jochum gerieten. Aufgrund weiterer Funde in importiertem russischem Lärchenholz (BRAASCH et al., 1999) mehren sich jedoch die Anzeichen, daß *B. fraudulentus* auch ein Nadelholzbewohner ist. Sein Vektor an Nadelgehölzen ist unbekannt. RÜHM (1956) fand ihn im Mulm von *Cerambyx scopolii* in *Prunus avium* und in *Populus nigra* sowie in *P. tremula*-Zweigen, in denen *Tryphophloeus granulatus* brütete. Seine nahe Verwandtschaft mit *B. mucronatus* und *B. xylophilus* läßt vermuten, daß er auch von *Monochamus* übertragen werden kann.

Als Vektor von *B. sexdentati* wird von RÜHM (1960), der diesen bei Hamburg feststellte, der Borkenkäfer *Ips sexdentatus* Boern. angegeben. *I. sexdentatus* ist ein weit verbreiteter, gefährlicher Kiefern schädling, der primären Schaden verursachen kann. Ob daran *B. sexdentati* einen Anteil haben kann, ist bislang unbekannt. Bei Untersuchungen in Beständen 20- und 30-jähriger Kiefern bei Potsdam wurde *B. sexdentati* durch *Tomicus piniperda* auf frisch gefällte Stämme übertragen. In Südeuropa ist dieser Nematode häufiger als in Mitteleuropa.

*Dryocoetes autographus* überträgt nach vorliegenden Untersuchungen sowohl *B. borealis* als auch *B. leoni*. RÜHM (1956) fand *B. sachsii* unter den Flügeldecken von *D. autographus*. Auch *Hylurgops palliatus* ist in der Lage, mehrere *Bursaphelenchus*-Arten zu übertragen. Da andererseits eine *Bursaphelenchus*-Art mehrere Vektoren haben kann, scheint die Nematode-Vektor-Be-

ziehung zwischen *Bursaphelenchus* und Borkenkäfern nicht hochgradig spezialisiert zu sein.

Es wird vermutet, daß in Deutschland weitere, auch unbeschriebene *Bursaphelenchus*-Arten vorkommen. Die deutsche (mitteleuropäische) *Bursaphelenchus*-Fauna unterscheidet sich teilweise von der südeuropäischen und asiatischen *Bursaphelenchus*-Fauna, grundlegend jedoch von der amerikanischen Fauna. Es sind bislang keine Arten bekannt, die sowohl in Mitteleuropa als auch auf dem amerikanischen Kontinent vorkommen. Die morphologischen Merkmale und Bestimmungskriterien der deutschen Arten werden in einer gesonderten Publikation ausführlich behandelt. Zur Durchführung der ITS-RFLP-Analyse sind zusätzliche Geräte erforderlich. Die Arbeitsabläufe sind jedoch standardisierbar. Die molekularbiologische Technik kann somit als wertvolle Ergänzung bei der Artbestimmung von *Bursaphelenchus*-Isolaten herangezogen werden.

Der intensive Holzimport sowohl aus überseeisch-westlicher als auch aus asiatisch-östlicher Richtung birgt das Risiko, daß die im Holz lange lebensfähigen Nematoden und ihre Vektoren über größere Entfernungen verbracht und eingeschleppt werden. Zwecks Verhinderung der Einschleppung von *B. xylophilus* aus Kiefernholz-nematoden-Befallsgebieten verfügen die meisten europäischen Länder über Quarantänebestimmungen, die gleichzeitig die Einschleppung weiterer *Bursaphelenchus*-Arten behindern. Aus Gebieten, für die hinsichtlich des Nadelholzimportes keine oder weniger strenge Quarantäneanforderungen bestehen, kann eine Verbringung von *Bursaphelenchus*-Arten jedoch nicht ausgeschlossen werden.

## Danksagung

Wir danken den Mitarbeitern der Forstämter der Länder für ihre stete Hilfsbereitschaft bei der Beschaffung der Untersuchungsproben und Frau B. TOENHARDT sowie Frau E. BUCHBACH für technische Assistenz. Herrn Dr. K. H. APEL von der Landesforstanstalt Eberswalde, Herrn K. LIEBENOW, Brandenburg, Herrn D. BRAASCH, Potsdam, und Herrn C. HOLZSCHUH, Forstliche Bundesversuchsanstalt, Wien, danken wir für die Bestimmung der Coleopteren.

## Literatur

- BAKKE, A., R. V. ANDERSON, T. KVAMME, 1991: Pathogenicity of the nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* to *Pinus sylvestris* seedlings: a greenhouse test. Scandinavian J. Forest Res. **6**, 407–412.
- BRAASCH, H., 1991: Erster Nachweis von *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya und Enda, 1979 in Deutschland und sein Vorkommen in Holzimporten aus der UdSSR nebst Ergänzungen zur Beschreibung dieser Art. Arch. Phytopath. Pflanzenschutz., Berlin **27**, 209–218.
- BRAASCH, H., 1996: Pathogenitätstests mit *Bursaphelenchus mucronatus* an Kiefern- und Fichtensämlingen in Deutschland. Eur. J. For. Path. **26**, 205–216.
- BRAASCH, H., 1998: *Bursaphelenchus hofmanni* sp. n. (Nematoda, Aphelenchoididae) from spruce wood in Germany. Nematologica **44**, 615–621.
- BRAASCH, H., W. BURGERMEISTER, K.-H. PASTRIK, 1995: Differentiation of three *Bursaphelenchus* species by means of RAPD-PCR. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz. **47**, 310–314.
- BRAASCH, H., W. BURGERMEISTER, I. WULFERT, U. SCHÖNFELD, 1999: Vorläufige Ergebnisse der nematologischen Untersuchung von importiertem Nadelholz aus dem asiatischen Teil Rußlands. 27. Tagung des Arbeitskreises Nematologie, Einbeck 17.–18. März 1999.
- BRAASCH, H., S. CAROPPO, H. MICHALOPOULOU, CH. TOMICZEK, 1998: Pathogenicity of various *Bursaphelenchus* species to pines and implications to European forests. Symposium on Sustainability of Pine Forests in Relation to Pine Wilt and Decline. Tokyo, Japan, 26–30 October, 1998, Abstracts S. 10.
- FERRIS, V. R., J. M. FERRIS, J. FAGHIHI, 1993: Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. Fundam. appl. Nematol. **16**, 177–184.



- FUCHS, A. G., 1930: Neue an Borke- und Rüsselkäfer gebundene Nematoden, halbparasitische und Wohnungseinmieter. Zool. Jahrb., Abt. Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere **59**, 505–646.
- FUCHS, A. G., 1937: Neue parasitische und halbparasitische Nematoden bei Borkekäfern und einige andere Nematoden. I. Teil. Zool. Jahrb., Abt. Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere **70**, 291–380.
- GIBLIN, R. M., 1985: Association of *Bursaphelenchus* sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) with nitidulid beetles (Coleoptera: Nitidulidae). Revue de Nematologie **8**, 369–375.
- HOYER, U., W. BURGERMEISTER, H. BRAASCH, 1998: Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda, Aphelenchoididae) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **50** (11), 273–277.
- HELLRIGL, K. G., 1971: Die Bionomie der europäischen *Monochamus*-Arten (Coleoptera, Cerambycidae) und ihre Bedeutung für die Forst- und Holzwirtschaft. Redia LII, 367–509.
- HUNT, D. J., 1993: Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae – Their systematics and bionomics. CAB INTERNATIONAL 352 p.
- IKEDA, T., K. ODA, 1980: The occurrence of attractiveness for *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) in nematode-infected pine trees. J. Jap. Soc. **62**, 432–434.
- IWAHORI, H., K. TSUDA, N. KANZAKI, K. IZUI, K. FUTAI, 1998: PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. Fundam. appl. Nematol. **21**, 655–666.
- JONES, T. M., M. S. PHILLIPS, M. R. ARMSTRONG, 1997: Molecular approaches in plant nematology. Fundam. appl. Nematol. **20**, 1–14.
- KISHI, Y., 1995: The pine wood nematode and the Japanese pine sawyer. Tokyo, Japan, 300 pp.
- KORENCHENKO, E. A., 1980: [Neue Nematodenarten aus der Familie Aphelenchoididae, Parasiten von Stammschädlingen von Larix dahurica] (russ.). Zoologicheskii zhurnal **59**, 1768–1788.
- KULINICH, O. A., I. A. KRUGLIC, A. S. EROSHENKO, N. V. KOLOSOVA, 1994: Occurrence and distribution of the nematode *Bursaphelenchus mucronatus* in the Russian Far East. Russian J. Nematol. **2**, 113–119.
- MC NAMARA, D. G., M. STØEN, 1988: A survey for *Bursaphelenchus* spp. in pine forests in Norway. EPPO-Bulletin **18**, 353–363.
- MAGNUSSON, C., L. M. SCHROEDER, 1989: First record of a *Bursaphelenchus* species (Nematoda) in *Monochamus* beetles in Scandinavia. Anz. Schädlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz **62**, 53–54.
- MAMIYA, Y., 1988: History of pine wilt disease in Japan. J. Nematol. **20**, 219–226.
- MAMIYA, Y., N. ENDA, 1979: *Bursaphelenchus mucronatus* n. sp. (Nematoda, Aphelenchoididae) from pine wood and its biology and pathogenicity to pine trees. Nematologica **25**, 353–361.
- PHILIS, J., 1996: An outlook on the association of *Bursaphelenchus leoni* with wilting pines in Cyprus. Nematol. mediterr. **24**, 221–225.
- RÜHM, W., 1956: Die Nematoden der Ipiden. Parasitologische Schriftenreihe **6**, 1–435.
- RÜHM, W., 1960: Ein Beitrag zur Nomenklatur und Systematik einiger mit Scolytiden vergesellschafteter Nematodenarten. Zool. Anz. **164**, 201–213.
- SCHAUER-BLUME, M., 1990: Preliminary investigations of pathogenicity of European *Bursaphelenchus* species in comparison to *Bursaphelenchus xylophilus* from Japan. Revue de Nematologie **13**, 191–195.
- SCHAUER-BLUME, M., D. STURHAN, 1989: Occurrence of pinewood nematode (*Bursaphelenchus* spp.) in the German Federal Republic? Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzd. **39**, 152–154.
- SCHMITZ, B., W. BURGERMEISTER, H. BRAASCH, 1998: Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzd. **50**, 310–317.
- SCHMUTZENHOFER, H., 1981: A nematode involved in the silver fir decline in Austria. Voluntary paper presented at the 17th UFRO world congress, Kyoto 1981. 5 S.
- SKARMOUTSOS, G., H. BRAASCH, H. MICHALOPOULOU, 1998: *Bursaphelenchus hellenicus* sp. n. (Nematoda, Aphelenchoididae) from Greek pine wood. Nematologica **44**, 623–629.
- VRAIN, T. C., 1993: Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group. J. Nematol. **25**, 361–364.
- ZIJLSTRA, C., A. E. M. LEVER, B. J. UENK, C. H. VAN SILFHOUT, 1995: Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Phytopathology **85** (10), 1231–1237.

Zur Veröffentlichung angenommen: 17. August 1999

Kontaktanschrift: Dr. Helen Braasch, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Abteilung für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Außenstelle Kleinmachnow, Stahnsdorfer Damm 81, D-14532 Kleinmachnow.